

## Plano de Estágio de Mestrado

**Tema:** *Nova geração de vectores lentivirais para terapia génica*

**Orientador:** Doutora Ana Sofia Coroadinha ([avalente@itqb.unl.pt](mailto:avalente@itqb.unl.pt))

**Local:** Unidade de Tecnologia de Células Animais - ITQB/IBET (Av. da República (EAN), 2781-901 Oeiras). Web: [//tca.itqb.unl.pt](http://tca.itqb.unl.pt)

### Resumo:

A terapia génica, o tratamento ou prevenção de doenças por transferência de material genético, é considerada por muitos como uma revolução na medicina actual. Após 20 anos de investigação, a Terapia Génica começa a aparecer como uma realidade. O uso da terapia génica no tratamento de doenças começou a ganhar credibilidade em 1990 quando se realizou o primeiro ensaio clínico, usando retrovírus para o tratamento de SCID, uma imunodeficiência de origem hereditária. Após alguns reveses os avanços da tecnologia permitiram desenvolver ferramentas mais seguras e eficientes demonstrando sucesso no tratamento de SCID. Em Novembro de 2012 foi aprovado pela entidade regulatória EMA a comercialização do primeiro biofármaco para terapia génica, Alipogene Tiparvec (Glybera®), para o tratamento de uma doença rara, a deficiência na lipoproteína lipase (LPLD).

A transferência de material genético nas células do paciente pode ser realizada utilizando diferentes métodos sendo que, os vectores virais apresentam geralmente uma elevada eficiência. Destes, os vectores lentivirais (LV) são uma ferramenta poderosa para transferência génica em células de mamífero, sendo cada vez mais utilizados em ensaios clínicos de terapia génica. Capazes de transduzir células em não-divisão e apresentando padrões de integração preferíveis, os lentivírus têm vindo a substituir os retrovírus derivados de Vírus da Leucemia Murina (MLV). São também o vector viral de escolha para a manipulação de células estaminais em investigação e terapia celular devido à sua elevada resistência aos efeitos de silenciamento transcricional que ocorre em células estaminais pluripotentes.

Para que possam ser eficientemente usados em terapia humana, os lentivírus têm de ser facilmente produzidos e cumprir restrições apertadas de segurança influenciadas quer pelo design das sequências de empacotamento quer pela linha celular produtora. Apesar do seu elevado potencial os vectores lentivirais apresentam obstáculos à sua utilização em larga escala sobretudo devido à citotoxicidade indutora de apoptose de alguns dos componentes virais. Embora existam correntemente sistemas para a produção destes vectores mas, apresentam dificuldades operacionais de produção a grande escala ou de segurança para o paciente. Este estágio de mestrado visa a elucidar a citotoxicidade dos componentes virais e a criação de uma nova linha celular de empacotamento para a produção constitutiva de LV minimizando ou eliminando essa toxicidade. Para tal recorrer-se-á à biologia molecular e engenharia celular de modo redesenhar o vector lentiviral e as células de empacotamento.

Este trabalho enquadra-se no âmbito do projecto FCT (CHIMERA-PTDC/EBB-BIO/118621/2010).

**Metodologias:** Cultura de células animais, manipulação de vectores lentivirais, clonagem de plasmídeos, real-time RT-PCR, citometria de fluxo, biologia molecular, analíticos vários.

### Bibliografia Recomendada:

- Hélio A. Tomás, Ana F. Rodrigues, Paula M. Alves and Ana S. Coroadinha (2013). Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges and Future Directions, Gene Therapy - Tools and Potential Applications, Dr. Francisco Martin (Ed.), ISBN: 978-953-51-1014-9, InTech, DOI: 10.5772/52534 (Available from: <http://www.intechopen.com/books/gene-therapy-tools-and-potential-applications/lentiviral-gene-therapy-vectors-challenges-and-future-directions>)

## Plano detalhado:

**Fase I** - Aprendizagem das técnicas de manipulação de células animais: trabalho em esterilidade, propagação de células, contagem de células, congelamento e descongelamento de células. Leitura bibliográfica sobre o trabalho.

**Fase II** - Aprendizagem das técnicas específicas à manipulação de vetores lentivirais: cultura de células produtoras e produção de lentivirus em *t-flask* (cultura em monocamada), quantificação de partículas virais totais e infecciosas. Caracterização do crescimento celular e produtividade viral. Análise dos vírus por citometria de fluxo, RT-PCR, Nanosight, western-blot, ELISA.

**Fase III:** Aprendizagem das técnicas específicas de biologia molecular e construção e produção de vetores de expressão necessários à realização do trabalho. Transfecção de células de mamífero e engenharia celular.

**Fase VI** – Caracterização e comparação de várias linhas celulares de mamífero (293, MDCK, Vero, Age1) e análise da citotoxicidade e apoptose induzida pelos componentes lentivirais. Análise mRNA e proteínas celulares. Ensaio de citotoxicidade. Desenvolvimento de linhas produtoras de lentivirus, sua caracterização e análise dos vetores virais produzidos.

**Fase V** – Elaboração da Tese de Mestrado.

**Duração do estágio:** 1 ano a tempo inteiro.

### Planeamento das Fases de Estágio

	Mês											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Fase I</b>	■											
<b>Fase II</b>		■	■	■								
<b>Fase III</b>			■	■	■	■	■	■				
<b>Fase IV</b>						■	■	■	■	■	■	
<b>Fase V</b>											■	■

**Número de estagiários:** 1\*

\*A escolha do Mestrando para o estágio será realizada através de entrevista.